OZYME
+33 (0)1 34 60 24 24 - info@ozyme.fr
www.ozyme.fr

TAMPON DE REACTION HF ou GC 5X : chaque tampon 5X contient 7,5 mM de $MgCl_2$

MANUEL D'UTILISATION : www.ozyme.fr/proto-fidelio

PRODUITS ASSOCIÉS :

Taq'Ozyme
Taq'Ozyme HS
Taq'Ozyme Purple Mix
PrimeSTAR® Max DNA Polymerase (Prémix)
PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (PCR < 30 kb, séquence GC riches)
ExactLadder® Ladder DNA PreMix 100 bp Plus
ExactLadder® Ladder DNA PreMix 2 Log
ExactLadder® DNA PCR PreMix
dNTP PreMix - 4 x 10 mM
dNTP PreMix - 4 x 25 mM

POUR COMMANDER : www.ozyme.fr

OZYME - Parc d'Activités du Pas du lac - 10 Avenue Ampère
78180 Montigny-Le-Bretonneux - France - Email : commande@ozyme.fr
Tél : +33 (0) 1 34 60 15 16 - Fax : +33 (0) 1 34 60 92 12

NUMERO DE FICHE TECHNIQUE : OZYA005-500-0514

PRODUIT A USAGE DE RECHERCHE UNIQUEMENT

FideliO® DNA Polymerase

500 unités

RÉFÉRENCE : OZYA005-500

CONCENTRATION : 2 unités/µl

VOLUME : FideliO® DNA Polymerase : 250 µl
Tampon de réaction HF 5X : 6 x 1,5 ml
Tampon de réaction GC 5X : 3 x 1,5 ml
$MgCl_2$ (50 mM) : 2 x 1,5 ml
DMSO (100 %) : 500 µl

STOCKAGE : -20°C

DURÉE DE VIE : à réception un an à -20°C

DESCRIPTIF :

La FideliO® DNA Polymerase est une ADN polymérase modifiée ultra-thermostable, rapide, fidèle et robuste. Cette enzymes est 50X plus fidèle qu'une Taq polymérase et amplifie avec une vitesse de 15 secondes/kb. Deux tampons de réaction sont inclus. Nous conseillons d'utiliser le tampon de réaction HF en première intention pour une fidélité maximale et le tampon de réaction GC pour l'amplification des séquences riches en GC.

DÉFINITION DE L'UNITÉ :

Une unité est définie comme la quantité d'enzyme qui incorpore 10 nmoles de dNTP dans un fragment d'ADN en 30 min à 74°C.

OZYME
+33 (0)1 34 60 24 24 - info@ozyme.fr
www.ozyme.fr

PROTOCOLE STANDARD :

Ce protocole est adapté pour une réaction de 50 µl à partir de matrices purifiées. Les amorces doivent avoir préférentiellement une température de fusion (Tm) proche de 60°C. Le tampon de réaction HF est le tampon à utiliser par défaut. Le tampon de réaction GC est dédié aux cibles riches en GC. C'est un point de départ pour les optimisations (cf. étape 3 ci-dessous) (section "Optimisations" du manuel d'utilisation). Après décongélation complète de chaque réactif, bien homogénéiser à l'aide d'un vortex, puis centrifuger brièvement tous les réactifs avant leur utilisation.

1. Les réactifs sont mélangés dans un micro-tube stérile, dans l'ordre suivant :

Réactif	Volume	Conc. finale
Eau stérile redistillée	q.s.p¤ 50 µl	-
Tampon de réaction HF 5X ou Tampon de réaction GC 5X	10 µl	1X
dNTP (mélange 10 mM de chaque)	1 µl	200 µM chacun
Amorce sens (ex : 20 µM)	0,5 µl	0,2 µM‡
Amorce anti-sens (ex : 20 µM)	0,5 µl	0,2 µM‡
Matrice d'ADN	Plasmide : 1 ng ADNg : 200 ng ADNc non dilué§ : <5 µl	< 250 ng /50 µl*
FideliO® DNA Polymerase (2 u/µl)	0,5 - 1 µl	1 - 2 unités*/50 µl
Volume final	50 µl	

q.s.p¤ : quantité suffisante pour. Le volume total de réaction peut être ajusté si nécessaire.
‡ : la concentration recommandée de chaque amorce est de 0,2 µM finale et peut être optimisée entre 0,2 et 1 µM.
§ : aliquot d'un mélange réactionnel de transcription inverse.
* : la quantité d'enzyme dépend de la matrice d'ADN utilisée. De plus amples informations sont présentées dans la section «optimisations» du manuel d'utilisation.

2. Le mélange réactionnel est vortexé doucement, puis centrifugé brièvement pour rassembler l'échantillon au fond du tube.

3. Programmation du thermocycleur :

Etape	Température	Temps	Cycles
Dénaturation initiale	98°C	30 sec	1
Dénaturation	98°C	5 - 10 sec	25-35
Hybridation	60°C*	10 - 30 sec	
Elongation	72°C	15 – 30 sec§	
Extension finale	72°C	5 min	
Stockage (optionnel)	4°C	variable	1

* : ou Tm le plus bas des deux amorces si les amorces sont inférieures à 20 nt ; Tm+3°C sur le Tm le plus bas des deux amorces si les amorces sont supérieures à 20 nt. Si les Tm des amorces sont ≥ 72 °C, utiliser le programme de PCR en 2 étapes (cf. section «Optimisations» du manuel d'utilisation)
§ : 30 sec/Kb pour les amplicons > 1 Kb

PRÉCAUTIONS :

Préparer et conserver le mélange réactionnel sur la glace jusqu'au démarrage des cycles de PCR. Ajouter toujours en dernier l'enzyme.

COMPOSANTS :

1 x 250 µl FideliO® DNA Polymerase
6 x 1,5 ml tampon de réaction HF 5X
3 x 1,5 ml tampon de réaction GC 5X
2 x 1,5 ml Solution $MgCl_2$ (50 mM)
1 x 500 µl DMSO (100%)

TAMPON DE STOCKAGE (FideliO® DNA Polymerase) :

Tris HCl 20 mM; KCl 100 mM; DTT 1 mM; EDTA 0,1 mM; Stabilisateur; glycérol 50%; pH 7,4 @ 25°C.